

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 04-234820

(43)Date of publication of application : 24.08.1992

(51)Int.Cl.

A61K 37/02  
A61K 9/127  
A61K 37/43  
A61K 37/64

(21)Application number : 03-105153

(71)Applicant : HOECHST AG

(22)Date of filing : 11.04.1991

(72)Inventor : KIBAT PAUL -GERHARD  
SANDOW JURGEN KURT

(30)Priority

Priority number : 90 4011864    Priority date : 12.04.1990    Priority country : DE

(54) PHARMACEUTICAL LIPOSOME PEPTIDE PRODUCT HAVING LONG -LASTING  
ACTIVITY AND ITS PREPARATION

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a pharmaceutical liposome peptide product for parenteral administration having a long-lasting activity.

CONSTITUTION: A liposome product for a peptide having an extended peptide release. The peptide has a molecular weight of 500-10,000, and the phospholipid component in the liposome membrane has a phase transition temperature of at least 20° C and mainly contains saturated fatty acids. The activity lasts 14 days or more after subcutaneous or intramuscular injection. The present invention provides also a method for preparing such a liposome product.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(10) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平4-234820

(43) 公開日 平成4年(1992)8月24日

(51) Int.Cl. <sup>4</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 37/02 9/127		5317-4C R 7329-4C L 7329-4C C 7329-4C F 7329-4C		

審査請求 未請求 請求項の数8(全8頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平3-105153	(71) 出願人	580000433 ヘキスト・アクチエンゲゼルシャフト ドイツ連邦共和国、フランクフルト・アム・マイン (番地無し)
(22) 出願日	平成3年(1991)4月11日	(72) 発明者	パウルー・ゲールハルト・キバト ドイツ連邦共和国デー-6235ホフハイム・アム・タウヌス、ガルテンシユトラーセ17
(31) 優先権主張番号	P 4 0 1 1 8 6 4 . 9	(72) 発明者	ユルゲン・クルト・ザンドウ ドイツ連邦共和国デー-6240ケーニヒシュタイン/タウヌス、アム・ハイデブラケン 22
(32) 優先日	1990年4月12日	(74) 代理人	弁理士 高木 千壽 (外2名)
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		

(54) 【発明の名称】 長期作用持続性リボソームペプチド薬学的生成物およびそれらの調製方法

(57) 【要約】 (修正有)

【目的】 本発明は非経口投与用の長期作用持続性リボソームペプチド薬学的生成物を提供する。

【構成】 延長されたペプチド放出を伴うペプチドのためのリボソーム生成物が記載される。それらペプチドは500～10000の分子量を有し、またリボソーム膜の脂質成分は少くとも20℃の相転移温度を有しそして主として飽和脂肪酸を含有する。活性は皮下または筋肉内注射の後14日間以上持続する。これらリボソーム生成物の調製方法も記載される。

(2)

特開平4-234820

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ペプチドは約500～10000の分子量を有し、リボソーム膜の脂質成分は少なくとも20℃の相転移温度を有しかつ主として飽和脂肪酸を含有し、そしてその活性は皮下または筋肉内注射後14日間を超えて持続することとを特徴とする、延長されたペプチド放出を伴うペプチドのためのリボソーム生成物。

【請求項2】 以下の条件、すなわち

- a) ペプチドはLHRHアナログ、プラジキニン拮抗剤、HOE 427またはヒルジン誘導体である、
  - b) 脂質成分の相転移温度は30℃より高い、
  - c) 脂質成分の主として飽和された脂肪酸は少なくとも14個の炭素原子の鎖長を有する、
  - d) リボソーム膜は添加ステロイドを含有する、
  - e) リボソームは少なくとも600～10000ナノメートルの平均容積当量粒子サイズを有する、
  - f) 活性は少なくとも20日間持続する
- という条件の一つまたはそれ以上を満たす請求項1記載のリボソーム生成物。

【請求項3】 以下の条件、すなわち

- a) ペプチドはLHRHアナログ、HOE 140、HOE 427またはHBW 023である、
  - b) 脂質成分の相転移温度は少なくとも37℃である、
  - c) 脂質成分の主として飽和された脂肪酸は少なくとも14個の炭素原子の鎖長を有する、
  - d) リボソーム膜は添加ステロイドを含有する、
  - e) リボソームは少なくとも600～10000ナノメートルの平均容積当量粒子サイズを有する、
  - f) 活性は少なくとも30日間持続する、
- という条件の一つまたはそれ以上を満たす請求項1記載のリボソーム生成物。

【請求項4】 以下の条件、すなわち

- a) ペプチドはブセレリンアセテートまたはHOE 013である、
  - b) 相転移温度は少なくとも37℃である、
  - c) 脂質成分は大豆胚のホスファチジルコリン(DPPC)である、
  - d) 膜は添加コレステロールを含有する、
  - e) リボソームは少なくとも600～10000ナノメートルの平均容積当量粒子サイズを有する、
  - f) 活性は少なくとも30日間持続する
- という条件の一つまたはそれ以上を満たす請求項1記載のリボソーム生成物。

【請求項5】 付加的荷電担体が膜材料中に含まれる請求項1記載のリボソーム生成物。

【請求項6】 抗酸化剤または安定化特性または放出に影響する特性を有する他の補助剤を含有する請求項1記載のリボソーム生成物。

2

【請求項7】 請求項1に記載のリボソーム生成物の皮下または筋肉内注射のための使用。

【請求項8】 a) α) 脂質成分、および適切な場合には脂肪酸と性添加剤を適当な有機溶媒に溶解し、その溶媒を除去しそして生成脂質マトリックスをペプチドの水性溶液を添加した後に脱着させてリボソームを形成し、その脱着剤は前記脂質成分の相転移温度よりも高い温度で行い、もしくは

β) 脂質成分、および適切な場合には脂肪酸と性添加剤、およびペプチドを適当な有機溶媒に溶解し、その溶媒を除去しそして水性媒体を用いて生成脂質マトリックスを脱着させ、その脱着剤は前記脂質成分の相転移温度よりも高い温度で行い、もしくは

γ) 脂質成分、および適切な場合には脂肪酸と性添加剤を揮発性有機溶媒に溶解し、その有機相と混和し得ない水性ペプチド溶液を添加し、生成二相系を前記脂質成分の相転移温度よりも高い温度で均質化することにより安定化乳濁液とし、そしてその有機溶媒を除去してリボソームを形成し、そしてα～γの方法により得られたリボソーム分散液を適切な場合には均質化および平衡化の後に、所要のペプチド含量となるように調製し、ビン詰めし、そして適切な場合には凍結乾燥するか、または

b) ペプチド不含有リボソームの凍結乾燥物をα、βもしくはγの方法により調製し、そして水性ペプチド溶液を適当な容器に分注しそこで凍結乾燥物とペプチド溶液を投与前に合することより成る請求項1記載のリボソーム生成物の調製方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は非経口投与用の長期作用持続性リボソームペプチド薬学的生成物に関する。本発明による調製物は皮下投与(s.c.)または筋肉内投与(i.m.)され、また14日間を超える作用持続期間を有する。本発明はさらにこれら生成物の調製方法にも関する。

【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】 リボソームは中空球体状の超微細粒子である。それらは両親媒性分子、通常は脂質質、より構成され、そして水性内部を囲繞する二重膜を有する。それらは生体類似(body-like)物質で構成され、広範にわたり様々な物質の担体として働き、また特定の要件を満たすよう特定の適合させることができる。これに関し、親水性基は主に水性内部容積内に被包されるのに対し脂肪酸と性物質は二重膜に結合する。

【0003】 リボソームは多数の医薬、例えば細胞静止剤、抗感染剤、および免疫調節剤に対する担体薬として提案されている(例えば Yalvin, M. B. および Leike

s. P. I., Med. Phys. 9 (1982))。リボソーム薬

(3)

特開平4-234820

学的生成物は主に非経口的に投与され、そしてしばしば静脈内投与が望ましい。その目的は通常デポー効果を利用し、副作用を減じそして活性を高めることにある。静脈内注射の後、リポソームはすべてのコロイド系と同様、細胞内皮系 (RES) 細胞によって取り込まれ、2日を超えない半減期をもって消失し、そして肝臓および脾臓に優先的に蓄積する (Senier, J. H., C.R.C. Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 3, 123 (1987))。静脈内注射よりも皮下または筋肉内注射の方が持続性の作用水準が得られる。リポソーム生成物の作用持続期間はベジクルからの物質放出、および注射部位からのその輸送、およびベジクルの分解に依存する。物質放出および分解は特にリポソーム膜の組成によって決まり、一方輸送は粒子サイズに依存する、すなわち粒子サイズが小さい程増大する (Arrowsmith et al., Int. J. Pharm. 20, 347-362 (1984))。もう一つの要因は生成物中の脂質濃度である (Jackson, A. J., Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol. 27, 293 (1980))。

【0004】リポソーム薬学的担体の筋肉内または皮下投与に関する前述の刊行物に記載の研究はいずれの場合も14日間を超える投与部位における生成物の薬学的放出または保持を示さなかった。逆に、様々なベジクル組成の、そして様々な医薬品を用いたこれらのリポソーム調製物に関する薬動学研究も活性物質放出が14日間で完了するかこの期間内にリポソームが分解してしまうかのいずれかを示した。

【0005】ペプチドのための皮下または筋肉内注射リポソーム生成物もすでに記載されている。インシュリンを持続放出するためのリポソーム組成物が例えばGB-B 2,050,287に記載されている。WO 87/04592なる公開番号の国際特許出願は、活性物質含有小SUV (unilamellar liposome, 粒子サイズ約30~100nm) と大MLV (multilamellar vesicle, 粒子サイズ約200~1000nm) との混合物で構成される膜不透過性分子 (例えばカルシトニン) のためのリポソーム放出系を記載している。Fukunaga et al. (Endocrinology 115, 757 (1984)) は、タンパク質のリポソーム被包体カルシトニンの長期にわたる血中カルシウム低下作用を記載している。これらの刊行物の実例によればいずれの場合も14日間を超えて活性を認めることはできなかった。

【0006】ペプチド、例えばLHRHアナログに対して、生物分解性ポリマーに基づく作用持続性組成物が記載されている (例えばマイクロカプセルについてはEP-B 0 052 510およびEP-B 0 145 240、他の放出制御系についてはEP-B 0 058 481参照)。EP-A 0 299 402は抗活性を有するLHRHアナログの作用持続性組成物を記載している。

【0007】前述の4つの刊行物中にはリポソーム組成物は記載されていないが、GB-B 2 050 287はLHRH含有リポソーム組成物を記載している。しかしこれは本発明組成物とは対照的に、放出調節剤を含有し、また皮下注射後約4日の消失半減期を有する。

【0008】LHRHの担体系としてのリポソームも3haeflerらが記載している (Pharmazie 42, 674 (1987) およびPharmazie 42, 689 (1987))。彼らは卵レシチンおよびホスファチジン酸の混合物からMLVを調製し、そしてウサギまたはブタにi.m.投与後に薬動量を研究した。注射部位からの消失半減期は20時間を超えなかった。この時間の後にLHRH血中レベルを測定することはもはやできなかった。

【0009】問題を解決するための手段) 書くべきことに、以下において特許付けられる特別なリポソーム組成物を用いれば場合によっては注射部位で35日後においてなおそれらを検出でき、またそれらが顯著な血中レベルおよび薬理学的効果をもたらすことが分かる。

【0010】従って、本発明はペプチドを長期にわたり放出するペプチド用リポソーム生成物であって、該ペプチドは約500~100000の分子量を有し、該リポソーム膜の脂質成分は少なくとも20℃の相転移温度を有しかつ主として飽和脂肪酸を含有し、そして活性は皮下または筋肉内注射後14日間を超える期間持続することと特徴とする前記リポソーム生成物に関する。

【0011】本発明によるリポソーム調製物はそれらの特別な組成に14日間を超える期間にわたって活性を確保する。すなわち、本生成物はそれらの特異的組成に投与部位に破壊されることなく14日間を超えて留まり、またこの期間にわたって所量の活性に十分な量の被包されたペプチド活性物質を放出する。

【0012】活性は好ましくは少なくとも20日間、特に30日間以上持続する。

【0013】注射部位から離れていく輸送の速度を最小に抑えるためにベジクル (リポソーム) の平均容積等価 (volume-equivalent) 粒子サイズは好ましくは600nm~1000nm、特に約800ナノメートルである。リポソーム膜の脂質成分は好ましくは30℃以上、特に少なくとも37℃の相転移温度を有する。それは主として少なくとも14個の炭素原子の鎖長の飽和脂肪酸を含有する。

【0014】適切な脂質はジミリスチル-PC (DMPC)、ジステアロイル-PC (DSPC)、シバルミトイル-PC (PC=ホスファチジルコリン)、または天然脂質からの水素添加または部分水素添加レシチンである。膜の安定化に適しているのは例えばステロイドの脂肪酸エステル添加剤、例えばコレステロールである。

【0015】リポソーム中に被包された (更に生化学的に許容される塩の形態にある) ペプチドは天然、合成ま

(4)

特開平4-234820

5

たは半合成起源のものであり、体内において特異的効果を有する。すなわち、以上および以下の記載において、ペプチドは本発明の範囲内においては、前記において特徴付けられたペプチドの遊離化合物および生化学的に許容される塩の双方を意味する。それらは約500~10000の分子量を有する。適当なペプチドの例はLHRHアナログ、ブラディキニン拮抗薬、インスリン、パソプレツシン、オキシトシン、カルシトニン、ヘパリン、ヒルジンおよびそれらの合成または半合成アナログである。好ましくは、LHRHアナログ、例えばブセルリン (buserelin)、HOE 013 (Ac-D-Nal-p-C1-D-Phe-D-Trp-Ser-Tyr-D-Ser (α-L-Rha)-Leu-Arg-Pro-Azagly-NH<sub>2</sub>、米国特許出願No. 390477に相当するEP-A 0 263 521参照) が被包される。しかしながらさらに例えばヒルジン例えばH BW 023 (米国特許出願No. 295 422に相当するEP-A 0 324 712に開示されたR-DN A-ヒルジン)、HOE 427 (=エビラチド (ebiractide)、[4-メチオニンジオキシド、8-D-リジン、9-フェニルアミン]-α-MSH-(4-9) (8-アミノ-オクテル) アミドトリアセテート、米国特許No. 4,623,715およびNo. 4,696,913に相当するEP-A 0 179 332参照) およびHOE 140 (=H-D-Arg-Arg-Pro-Hyp-Gly-Thl-Ser-D-Tic-Oic-Arg-OH、6CH<sub>3</sub>COOH、米国特許出願No. 374 162に相当するEP-A 0 370 453参照) なども適している。

【0016】 活性物質として選んだペプチドが生体内で投与後は極めて短時間しか有効でないことは知られている (Banga et al., Int. J. Pharm. 45, 15-50 (1988))。それらは酵素によりまたは化学反応により失活しそして極めて速やかに消失する。これらのペプチドを被包して本発明によるリボソーム生成物とすることにより、該物質を体内での速かな代謝的失活から守り、そして長期間にわたって、無変化活性物質の長期持続性の連続放出を確保することができる。

【0017】 リボソームはユニラメラまたはマルチラメラ型のいずれかである。ペプチドは水性内部に溶解して存在しても、またリボソーム膜に存在してもよい。活性物質の放出は特に膜を介して調節される。すなわちその性質および割合によっては膜中の活性物質含量が活性物質の放出持続期間に影響する。大型の、例えばマルチラメラ型のリボソーム内にペプチドを被包すると、例えば作用持続期間は活性物質が恒体系に結合するため例えば20日以上にまで増加する。本発明によるリボソーム生成物を用いれば例えば30日後でさえも注射部位にリボソームをなおも認めることができる。さらに、この期間後もなお活性が放出できる。

6

【0018】 活性物質の放出はさらに膜部分に正または負に荷電した荷電恒体例えばジバルミトール-ホスファチジルグリセロールまたはステアリアルアミンなどを添加するか、抗酸化剤または安定化特性または放出に影響を与える特性を有する他の助剤を添加することにより調節することができる。

【0019】 リボソームは原則として文献 (例えば Lichtenberg, D., Methods of Biochemical Analysis 33, 337 (1988)) に知られるすべての方法により調製することができる。特に施しているのはより大型のリボソームを与える調製技術である。

【0020】 本発明によるリボソーム生成物の調製方法は、

a) α) 磷脂質成分および適切な場合には脂肪親和性添加剤を適当な有機溶媒に溶解し、その溶媒を除去しそして生成磷脂マトリックスをペプチドの水性溶液を添加した後に脱着 (detachment) させてリボソームを形成し、その際該脱着は前記磷脂質成分の相転移温度よりも高い温度で行い、もしくは

β) 磷脂質成分、および適切な場合には脂肪親和性添加剤、およびペプチドを適当な有機溶媒に溶解し、その溶媒を除去しそして水性媒質を用いて生成磷脂マトリックスを脱着させ、その際該脱着は前記磷脂質成分の相転移温度よりも高い温度で行い、もしくは

γ) 磷脂質成分、および適切な場合には脂肪親和性添加剤を揮発性有機溶媒に溶解し、その有機相と中和し得ない水性ペプチド溶液を添加し、生成二相系を前記磷脂質成分の相転移温度よりも高い温度で均質化 (ホモジナイズ) することにより安定乳濁液とし、そしてその有機溶媒を除去してリボソームを形成し、そしてα~γの方法により得られたリボソーム分散液を適切な場合には均質化および平衡化の後に、所要のペプチド含量となるように調節し、そしてビン詰めし、そして適切な場合には凍結乾燥するか、または

b) ペプチド不含有リボソームの凍結乾燥物をα、βもしくはγの方法により調製し、そして水性ペプチド溶液を適当な容量に分注しそこで凍結乾燥物とペプチド溶液を投与前に合一することより成る。

【0021】 本発明による方法により得られた凍結乾燥物は常法により、例えば注射用水の添加により筋肉内または皮下投与に適した形態に変えられる。

【0022】 本発明方法に用いられる水性媒質は、水、または水と有機溶媒例えばメタノールまたはエタノールとの混合物で構成される。それは付加的に添加剤、例えば塩化ナトリウムまたは緩衝剤例えばホスフェート緩衝剤を含んでもよい。水性ペプチド溶液もそのような添加剤を有することができる。

【0023】 前記方法は次のようにして行うのが便利である：

50 方法a)

(5)

特開平4-234820

7

α) 脂質および適切な場合には脂肪親和性添加剤 (例えばコレステロール) を有機溶媒体例えばエタノール、メタノール、ジクロロメタン、クロロホルムまたは *tert*-ブタノールに溶解する。その溶液をさしきりのある脂質残渣を許さずして最大表面積の脂質マトリックスを生じる方法により除去する。この目的に特に適しているのは回転蒸発器による蒸発および遠隔乾燥、またはそれら方法の組合せである。

【0024】リポソームを形成するには、ペプチド医薬の必要に応じ既述した水性溶液を添加後、脂質マトリックスを脱着させる。この過程はその混合物の温度が脂質成分の相転移温度よりも高くかつ当然ながらそのペプチドの臨界的分解温度よりも低くなるようにして行う必要がある。それは容器の攪拌により、また速度を高めるための助剤 (例えばガラスビーズまたはスクレーパー) の使用により助長される。そのリポソーム分散液を次に、例えば Ultraturrax、高圧均質化装置および同等の過程を用いた均質化工程にかけることができる。形成されたリポソームをそれらが安定した状態および最適な濃度に通ずるまで高められた温度で平衡させる。分散液の均質度はそれを例えば  $1 \sim 20 \mu\text{m}$  顆粒直径の膜またはガラスフィルターを通して篩過することにより粗面分を除去することによって向上する。

【0025】医薬の被包化が定量的ではないときは、多くの場合、被包されなかった分を除去する必要がある。クロスフロー (cross-flow) 濾過は結合された医薬と遊離状態の医薬の分離上特に有利であり、さらに膜を適切に選択すれば微細なりポソーム成分 (約  $400 \text{nm}$  以下) を除くこともできる。遠心分離法、クロマトグラフィー法 (ゲル、イオン交換または吸収クロマトグラフィー) または、吸着または消化という方法による遊離ペプチド除去を用いることもできる。

【0026】仕上がったリポソーム分散液の医薬濃度を適当な方法により検査しそして所要の含量となるよう希釈する。それはアンプルまたはバイアルに分注されそして適当な条件下に貯蔵される。無学的調製物を調製する際のすべての工程は無菌条件下に行われる。

【0027】β) ペプチドを脂肪親和性成分と共に有機溶媒に溶解する場合は方法 α) と同様に調製を行う。この方法は脂肪親和性を有するペプチドに特に適している。適当な溶媒はエタノール、メタノールおよび *tert*-ブタノールである。

【0028】γ) 脂質および脂肪親和性添加剤 (例えばコレステロール) を揮発性有機溶媒例えばジエチルエーテル、ジイソプロピルエーテルまたはそのジクロロメタンまたはクロロホルムとの混合物に溶解する。この溶液に疎水性相と混和し得ない水性ペプチド溶液を添加する。その二相系を適当な均質化過程 (Ultraturrax、超音波、高圧ホモジナイザー) により、脂質成分の相転移温度よりも高くかつペプチドの臨界的分解温度よりも低

8

い温度で安定な乳濁液に浸る。この後、有機溶媒を所要温度で真空下に除去する。リポソームは準安定な、通常ゲル様の中間段階を経て形成され、また更なる溶媒の除去により実質的に不純物不含となる。

【0029】それらリポソームは、方法 α) について記載されたとおりさらに処理され、脂質されビン詰めされる。

【0030】方法 α~γ) によって調製されそしてその水性溶液中に低濃度物質を添加含有する、またはその調製後に低濃度保護剤が添加されたリポソームは凍結乾燥できる。選択される添加剤と凍結乾燥過程とを相互に適切なものとすることによって投与前のリポソーム再構成を容易にしたりリポソームに高割合のペプチド医薬を結合状態で含有させる。適当な低濃度保護剤の例はマンニトール、キシリトール、ソルビトール、トレハロース、デキストラン、ポリビニルピロリドン、アルブミン、ヒドロキシエチルスターチおよび変性ゼラチンタイプである。

【0031】方法 β)

活性物質を含まないリポソームを方法 α) α、β または γ) に従って調製し、そして前述の如く凍結乾燥する。リポソーム分散液を調製するためには被包水性ペプチド溶液をその凍結乾燥物に添加する。このリポソーム分散液を次いで投与することができる。

【0032】活性物質を含まず、そして方法 α) α、β または γ) により得られるリポソームは適切な場合には、適当な均質化過程により小ベジクルの分散液に転化される。特に適した過程は例えばマイクロフィルダイザー (microfluidizer) を用いた高圧均質化であるが、さらにこれ以外に超音波または Ultraturrax による処理を行うことも可能である。これによって生成された小リポソームは次いで凍過による滅菌にかけてから前述の如く凍結乾燥することができる。これらのリポソームを投与前にペプチド溶液と混合する。このようにして得られた分散液は主として大ベジクルを有する。

【0033】本発明によるリポソーム生成物は、親性物質の長期持続性連続放出を示す。それらはさらに貯蔵安定性が大きい点で優れている。すなわち、実施例 9 に記載するように、12ヶ月間貯蔵後も99%以上のペプチドが依然としてリポソームに結合しており、また粒子サイズは不変である。

【0034】

【実施例】実施例 1

200mgのLHRH拮抗剤 (HOE 013)、1348mgの水素添加卵レシチン (相転移温度約  $63^{\circ}\text{C}$ ) および652mgのコレステロールを50mlのメタノールに  $50^{\circ}\text{C}$  で溶解する。その溶液を  $0.2 \mu\text{m}$  フィルターを通して濾過することにより滅菌しそして無菌条件下にリポソームに転化する。そのために、脂質を脂質マトリックス (フィルム) が形成されるまで回転蒸発器で除去する。室素を通じながら20mlの滅菌化ナトリウム溶液

(6)

特開平4-234820

9

10

を脂質フィルムに添加し、そしてそのフィルムを55℃で2時間内に容積から脱着し、そして50℃で一晩乾燥する。生成リボソーム分散液を5 $\mu$ m膜フィルターを通して濾過しそして塩化ナトリウム溶液で100mlとする。生成分散液をポリカーボネート造粒釜に移し、そして20,000 $\times$ gおよび5℃で5分間遠心分離する。溶解された未包被LHRH拮抗剤を含有する上清を除去する。新鮮な塩化ナトリウム溶液の添加後、リボソームを再分散しそして遠心分離を5回繰り返す。最後にリボソームを20mlに調整する。活性物質含量をHPLCにより測定後、リボソーム分散液を1.6mg/ml HOE 013の最終濃度となるように塩化ナトリウム溶液で希釈しそして滅菌バイアルに分注する。容積関連 (volume-related) 粒子サイズは平均2300ナノメートルであり、そして被包効率は20%である。

【0035】実施例2

実施例1で得た2 $\times$ 1mlのリボソーム (3200 $\mu$ gの\*

LHRH拮抗剤HOE 013またはプラセボ皮下注射後の雄ラットの周産抑制

群No.	処理(用量)	周産抑制のあったラット数 /1群当たりのラット数 産内死産死産日					
		1	7	14	21	28	35
1	対照 (プラセボ)	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11
2	対照 毎日注射 (60 $\mu$ gのBOE 013s.c.)	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11
3	リボソーム (3200 $\mu$ gのHOE 013の 単一用量s.c.)	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8

【0038】実施例3

40mgのLHRH拮抗剤HOE 013、262mgのジパルミトイル-ホスファチジル-コリン (DPPC) (相転移温度約41℃) および138mgのコレステロールを15mlのメタノールに溶解する。リボソームは実施例1と同様にして調製されるが、フィルム脱着およびリボソームベレットの量調整のための水相容量は4mlである。

【0039】実施例4

40mgのLHRH拮抗剤HOE 013、158.7mgのジミリストイル-ホスファチジル-コリン (DMPC) (相転移温度約23℃) および41.3mgのコレステロ

\*HOE 013の単一用量に相当する) を体重約200gの雄ラットの皮下注射する。対照は溶媒 (塩化ナトリウム溶液のみ) (プラセボ) のみが投与される同じ試験動物群と日用量のLHRH拮抗剤溶液 (60 $\mu$ g) (5%強度マンニトール溶液中) で処理される動物群で構成する。それら動物の発情抑制を毎週発情塗抹 (estrous smear) により点検する。35日目に尿中のHOE 013濃度を測定しそして24時間排泄量を算出する。

【0036】結果 (表1参照) はリボソーム製動物が二つの対照群とは対照的に35日後もなお明らかに抑制されていることを示している。35日目の排泄速度 (4.6 $\mu$ g) はリボソーム調製物の場合に拮抗剤の顕著な排泄があることを実証している。この排泄速度は血漿濃度と密接に関連する。

【0037】

【表1】

30 ールを実施例3に記載の如くリボソームに転化する。

【0040】実施例5

実施例1、3および4で得たリボソームの放出を試験管内で試験した。このため1mlの分散液を透析チューブに封入し、10mlの緩衝液 (tris-HCl 0.1M, pH 7.4 NaCl で等張化) を入れた容器に入れそして振盪しながら37℃でインキュベートする。緩衝液は毎日変えそしてHOE 013含量を分析する。結果 (表2参照) は放出がリボソーム膜の組成に著しく依存することを示している。

【0041】

【表2】

(7)

特開平4-234820

11

12

Et	ペプチド放出 (単位%) 水素添加卵レシチン/CH (実施例1)	DPPC/CH (実施例3)	DHPC/CH (実施例4)
0	0	0	0
0.125	12.5	22.5	41.53
1	23.8	34.3	63.7
2	33.3	47.9	77.4
4	38.2	53.3	83.5
7	41.5	59.5	89.3
10	67.3	79.9	93.8
14	74.4	89.9	97.5
21	92.3	95.5	100.0
28	97.2	98.7	
35	98.1	99.8	

## 【0042】実施例6

HOE 013に代えて、200mgのプセリンアセテートを実施例1に記載の如くリボソームに転化する。容量法測定粒子サイズは平均1800nmであり、また被包効率は10.6%である。

## 【0043】実施例7

250mgの水素添加大豆レシチンを33.3mlのジイソプロピルエーテルおよび16.7mlのジクロロメタンに40℃で溶解する。4mlのヒルジン (HBW 023) を10mMホスフェート緩衝液 (pH 7.4) を含む溶液を添加する。その混合物を超音波浴で1分間ホモジナイズする。有機溶媒を回転蒸発器で55℃で除去する。形成されたりボソームを1時間平衡化し、次いで5μm膜フィルターを通して濾過する。未被包成分を8000×gで3回遠心分離することにより除去した後リボソームペレットを10mlとなるよう調整する。被包効率は11.5%である。

## 【0044】実施例8

135mgの水素添加卵レシチンを8mlのジイソプロピルエーテルおよび4mlのジクロロメタンに40℃で溶解する。4mlのエピラチド (HOE 427) を10mMアセテート緩衝液 (pH 3.5) 中に含む溶液を添加する。その混合物を超音波浴で1分間ホモジナイズする。有機溶媒を回転蒸発器で55℃で除去する。形成されたりボソームを1時間平衡させ、次いで5μm膜フィルターを通して濾過する。未被包成分を16000×gで3回遠心分離することにより除去した後、リボソームペレットを10mlとなるよう調整する。被包効率は15%である。

## 【0045】実施例9

実施例1で得たりボソームを4℃で12ヶ月貯蔵した後それらの貯蔵安定性を調べた。貯蔵後リボソームから分散液 (水) 中に放出されるペプチド成分を16000rpmで遠心分離することにより除去しそしてHPLCにより測定する。12ヶ月間貯蔵後、0.75%の被包され

た活性物質が放出され、そして99.25%のHOE 013はなおりボソームに結合される。フォトン相関分光法により測定された平均容量法測定粒子サイズは2300nmで初期値と変わらない。

## 【0046】実施例10

2000mgのジバルミトイルホスファチジルコリン (DPPC)、水素添加卵レシチンまたは卵レシチンおよびコレステロール (CH) の等モル混合物をメタノールに溶解する。溶液を回転蒸発器で55℃で真空蒸発させる。脂質マトリックスを20.0mlの200mgのHOE 013を5.4%強度水性マンニトール溶液中に含む溶液を用いて55℃で脱着させ、そして製氷浴で50℃で一晩平衡させる。形成されたりボソーム分散液を5μmフィルターを通して濾過し、次いで約20℃に冷却する。未被包成分を1000rpmで10分間遠心分離することにより除去する。0.9%強度塩化ナトリウム溶液を添加し再び分散させた後遠心分離を2回繰り返す。

【0047】精製リボソーム成分を所要のHOE 013濃度となるように希釈しそして滅菌バイアルに分注する。被包効率は、DPPC/コレステロール (50:50mol%) より成るリボソームについては61.6%、水素添加卵レシチン (HPC) /コレステロール (50:50mol%) より成るリボソームについては78.9%、卵レシチン (PC) /コレステロール (50:50mol%) より成るリボソームについては74.3%である。

## 【0048】実施例11

実施例10で得たりボソームを平均体積190~200gの離ラットに皮下注射する。用量は1匹あたり7.2mgのHOE 013である。対照群と比較される発癌抑制は所定の時点での腫瘍組織診断により測定される。平均発癌抑制の期間は

PC/CHリボソームについては14日間 (群2)

HPC/CHリボソームについては34日間 (群3)

DPPC/CHリボソームについては48日間 (群4)



(8)

特開平4-234820

13

14

である。

【0049】

\*【表3】

7. 2g/匹のHIOE 013を皮下注射した後のラットにおける腫瘍抑制

群	腫瘍抑制のあったラット数/群あたりのラット数 注射後の日数													
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14
1(対照)	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
2	0/3	0/3	0/3	1/3	3/3	6/3	8/3	8/3	8/3	8/3	8/3	8/3	8/3	8/3
3	0/7	0/7	0/7	1/7	6/7	5/7	5/7	1/7	6/7	6/7	1/7	1/7	1/7	1/7
4	1/3	1/3	2/3	5/3	7/3	8/3	8/3	7/3	6/3	7/3	7/3	7/3	7/3	4/3

群	腫瘍抑制のあったラット数/群あたりのラット数 注射後の日数													
	16	21	23	28	31	34	37	41	44	48				
1(対照)	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
2	2/3	7/3	7/3	7/3	5/3	6/3	2/3	2/3	2/3	0/3				
3	7/7	7/7	8/7	5/7	5/7	5/7	4/7	5/7	3/7	2/7				
4	2/3	2/3	1/3	2/3	2/3	4/3	0/3	0/3	0/3	0/3				

【0050】実施例12

3.37gの水素添加卵レシチンおよび1.63gのコレステロールを100mlのメタノールに溶解しそして回転蒸発器で60℃で30分間蒸発させて脂質フィルムを得る。ガラスビーズを添加後、60℃で平衡させた100mlのマニトール溶液(5.4%)を添加しそしてその回転蒸発器上のフラスコを60℃で60分間回転させることによりフィルムを形成させる。

【0051】リボソーム分散液を Nanejet (Verstallen により供給) でスリット幅を10および温度を60℃

20 として15分間処理する。形成されるリボソームを0.2μm膜フィルターを通して濾過しそして冷却後バイアルに分注し次いで凍結乾燥する。

【0052】凍結乾燥物を再構成するには注射用水1ml当たり1mgのHIOE 013を含む溶液を添加し、そしてその混合物を60℃で原置する。

【0053】未被包成分を遠心分離の繰り返しにより実施例1と同様にして除去する。リボソーム結合成分は脂性物質の28.9%である。

フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>3</sup>A61K 37/43  
37/64

識別記号

庁内整理番号

B317-4C  
B317-4C

F1

技術表示箇所